



AD

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/55, A61K 38/37	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/34930 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. September 1997 (25.09.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT97/00055 (22) Internationales Anmeldedatum: 13. März 1997 (13.03.97) (30) Prioritätsdaten: A 494/96 15. März 1996 (15.03.96) AT (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FISCHER, Bernhard [DE/AT]; Jägerhausgasse 14/11, A-1120 Wien (AT). MITTERER, Artur [AT/AT]; A-2304 Mannsdorf 116 (AT). DORNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT). (74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: STABLE FACTOR VIII/ VON WILLEBRAND FACTOR COMPLEX (54) Bezeichnung: STABILER FAKTOR VIII/vWF-KOMPLEX (57) Abstract <p>The invention relates to a stable factor VIII/ von Willebrand factor complex which contains high-molecular von Willebrand factor (vWF) multimers and is free of low-molecular vWF molecules and proteolytic vWF decomposition products. The invention also relates to a process for preparing said complex.</p> (57) Zusammenfassung <p>Beschrieben wird ein stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält und frei ist von niedermolekularen vWF-Molekülen und proteolytischen vWF-Abbauprodukten, sowie ein Verfahren zur Herstellung dieses Komplexes.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex

Die Erfindung betrifft einen stabilen virussicheren Faktor VIII-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere mit hoher struktureller Integrität enthält und frei ist von niedermolekularen vWF-Molekülen und proteolytischen vWF-Abbauprodukten. Desweiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur Gewinnung und Herstellung eines stabilen Faktor VIII-Komplexes sowie pharmazeutische Präparationen davon.

Die Blutgerinnung ist ein komplexer Prozeß, der die sequentielle Interaktion einer Reihe von Komponenten, insbesondere von Fibrinogen, Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI und Faktor XII einschließt. Der Verlust einer dieser Komponenten oder die Inhibierung ihrer Funktionalität führt zu einer verstärkten Blutgerinnungsneigung, die bei einigen Patienten lebensbedrohlich sein kann.

Von Willebrand-Faktor (vWF) zirkuliert im Plasma komplexiert mit Faktor VIII, wobei Faktor VIII die Blutgerinnung unterstützt und vWF im Komplex mit Faktor VIII diesen stabilisiert und vor proteolytischem Abbau schützt. Durch seine Funktion bei der Plättchenaggregation greift vWF auch direkt in die Blutgerinnung ein. Der vWF ist ein Glykoprotein, welches in verschiedenen Zellen von Säugern gebildet und anschließend in die Zirkulation freigesetzt wird. Dabei wird in den Zellen ausgehend von einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 220 kD durch Ausbildung von mehreren Schwefelbrücken ein vWF-Dimer mit einem Molekulargewicht von 550 kD gebildet. Aus den vWF-Dimeren werden dann durch Verknüpfung weitere Polymere des vWF mit immer höherem Molekulargewicht, bis zu 20 Millionen Dalton, hergestellt. vWF existiert daher im Plasma in einer Serie von multimeren Formen von einem Molekulargewicht von 1×10^6 bis 20×10^6 Dalton. Es wird vermutet, daß insbesondere den hochmolekularen vWF-Multimeren eine essentielle Bedeutung bei der Blutgerinnung zukommt.

Neben der Carrier-Funktion für Gerinnungsfaktor VIII besteht für den vWF die Funktion in der Brücken-Bildung zwischen Gefäßwand

und der Plättchen und Plättchenagglutination. Die Grundlage zur Plättchenagglutination ist durch die Bindung des vWF an Oberflächen-Rezeptoren (Glykoproteine Ib, IIb/IIIa) gegeben. Die Bindungsstelle innerhalb des vWF zur Bindung an GP Ib befindet sich im Disulfid-Loop Cys(509)-Cys(695). Es ist bekannt, daß die Plättchenagglutination mit einer Bindung des vWF an das Glykoprotein Ib beginnt. Nach einer Aktivierungssignal kommt es dann zur Bindung des vWF an den Glykoprotein IIb/IIIa-Komplex und der Agglutination. Die Plättchenagglutination setzt somit die Bindung des vWF an die Oberflächenrezeptoren voraus; durch die Bindung mehrerer Plättchen durch ein vWF-Molekül kommt es in Folge zur Agglutination. vWF-Plättchenbindung stellt somit die molekulare Ursache für die Plättchenagglutination dar.

Bei der Hämophilie ist die Blutgerinnung durch Mangel an bestimmten plasmatischen Blutgerinnungsfaktoren gestört. Bei der Hämophilie A beruht die Blutungsneigung auf einem Mangel an Faktor VIII bzw. einem Mangel an vWF, der ein wesentlicher Bestandteil des Faktors VIII darstellt. Die Behandlung der Hämophilie A erfolgt in erster Linie durch Ersatz des fehlenden Gerinnungsfaktors durch Faktorenkonzentrate z.B. durch Infusion von Faktor VIII, Faktor VIII-Komplexes oder vWF.

Das vWF-Syndrom besitzt mehrere Krankheitsbilder, die auf eine Unter- oder Überproduktion des vWFs zurückzuführen sind. So führt z.B. eine Überproduktion von vWF zur vermehrten Neigung von Thrombosen, wohingegen eine Unterversorgung durch die Abwesenheit oder eine Reduktion von hochmolekularen Formen des vWF begründet ist, die sich dadurch manifestiert, daß eine vermehrte Blutungsneigung und eine verlängerte Blutungszeit durch eine inhibierte Plättchenaggregation auftritt. Der Mangel an vWF kann auch eine phänotypische Hämophilie A hervorrufen, da der vWF ein wesentlicher Bestandteil des funktionellen Faktor VIII ist. In diesen Fällen ist die Halbwertszeit des Faktor VIII derart verringert, daß seine Funktion in der Blutgerinnungskaskade beeinträchtigt ist. Patienten mit von Willebrand-Syndrom (vWD) weisen daher oftmals Faktor VIII-Defizienz auf. Bei diesen Patienten ist die reduzierte Faktor VIII-Aktivität nicht die Konsequenz eines Defekts des X-chromosomalen Genes, sondern ist eine indi-

rekte Folge der quantitativen und qualitativen Veränderung des vWF im Plasma. Die Unterscheidung zwischen Hämophile A und vWD kann normalerweise durch Messen des vWF-Antigens oder durch Bestimmen der Ristocetin-Kofaktor-Aktivität erfolgen. Sowohl der vWF-Antigengehalt als auch die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität ist bei den meisten vWD-Patienten erniedrigt, wogegen sie in Hämophilie A-Patienten normal ist.

Konventionelle Methoden zur Therapie des von Willebrand-Syndroms erfolgen mit aus Plasma gewonnenem vWF, wobei es eine Reihe von Ansätzen gibt, vWD-Patienten mit gereinigtem vWF oder Faktor VIII/vWF-Komplex zu therapieren.

Die Reinigung von Faktor VIII oder Faktor VIII-Komplex aus Plasma oder Kryopräzipitat wird insbesondere dadurch erschwert, daß Faktor VIII nur in sehr geringen Mengen im Plasma vorkommt, extrem labil ist und die Assoziation von Faktor VIII mit vWF unter spezifischen Bedingungen reversibel ist. Faktor VIII wird durch Reinigung und Konzentrierung aus Plasma gewonnen, jedoch kann es abhängig vom Reinigungsverfahren zur Instabilität und Verlust der Faktor VIII-Aktivität aufgrund der Trennung von vWF und Faktor VIII während der Reinigung kommen. Das Endprodukt ist daher oft eine Mischung aus stabilem Faktor VIII-Komplex und instabilem Faktor VIII, sowie von kontamierenden Proteinen, wie z.B. Fibrinogen, Fibronectin oder Vitamin K-abhängigen Proteinen, die durch die Reinigung nicht entfernt werden konnten. Aufgrund der Instabilität des gereinigten Komplexes werden Stabilisatoren, wie Albumin oder Aminosäuren etc., zugesetzt. Die Anwesenheit von kontaminierenden Proteinen und/oder Stabilisatoren im gereinigten Produkt reduzierten jedoch die spezifische Aktivität des Faktor VIII-Komplexes.

Die EP 0 468 181 beschreibt ein Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII aus humanem Plasma durch Ionenaustauschchromatographie, Elution des Faktor VIII mit hoher Ionenstärke bei saurem pH und Sammeln des Eluats in Anwesenheit eines Stabilisators, wie Heparin, Albumin und PEG und Lysin oder Histidin als Antiprotease. Die spezifische Aktivität nach Zugabe von Albumin sinkt jedoch von 300 bis 1200 U/mg Protein auf 18-24 U/mg Protein.

Madaras et al. (Haemostasis 7:321-331 (1978)) beschreiben ein Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII an Heparin-Sepharose und Elution mit steigenden NaCl-Konzentrationen. Der so erhaltene Faktor VIII hatte jedoch nur geringe Aktivität.

Die US 5,252,709 beschreibt Verfahren zur Trennung von Faktor VIII, vWF, Fibronektin und Fibrinogen aus humanem Plasma, wobei zuerst Faktor VIII, vWF und Fibronektin an einen Ionentauscher von DEAE-Typ gebunden werden und anschließend durch steigende Salzkonzentrationen vom Ionenaustauscher getrennt eluiert werden.

Zimmerman et al. (US 4,361,509) beschreiben ein Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII, wobei der Faktor VIII/vWF-Komplex an einen monoklonalen anti-vWF-Antikörper gebunden wird und Faktor VIII vom Komplex durch CaCl_2 -Ionen dissoziiert wird. Der so erhaltene Faktor VIII wird anschließend über einen weiteren Chromatographieschritt in reiner Form gewonnen, muß jedoch durch Zugabe von humanem Albumin stabilisiert werden.

Durch die Expression von Faktor VIII in rekombinanten Zellen (Wood et al. (1984), Nature 312:330-337) konnte Faktor VIII gentechnisch hergestellt werden, jedoch konnte erst durch Zugabe oder Koexpression von vWF eine kommerziell einsetzbare Ausbeute an rekombinantem Faktor VIII erzielt werden. Zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates wird vWF jedoch während des Reinigungsprozesses bis auf eine unwesentliche Restmenge vom Faktor VIII abgetrennt und der gereinigte rekombinante Faktor VIII mit Albumin stabilisiert (Griffith et al. (1991), Ann. Hematol 63:166-171).

Für den Einsatz zur Therapie von Patienten mit Hämophilie A, aber auch mit von Willebrand-Syndrom ist ein gereinigter Faktor VIII, komplexiert mit vWF, wünschenswert (Berntorp (1994), Haemostasis 24:289-297). Insbesondere wird immer wieder betont, daß in Präparaten ohne oder nur einem geringen Gehalt an vWF, eine verlängerte Blutungszeit und eine geringe Faktor VIII:C-Halbwertszeit in vivo zu beobachten ist. Eine Normalisierung von vWF in vivo ist wichtig, um die Konzentration von Faktor VIII im

Plasma sowohl durch Reduktion der Faktor VIII-Eliminierungsrate als auch durch die Unterstützung der Freisetzung von endogenem Faktor VIII, aufrecht zu erhalten (Lethagen et al. (1992), Ann. Hematol. 65:253-259).

Die DE 3 504 385 beschreibt die Durchführung einer Ionenaustauschchromatographie zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex, wobei der Faktor VIII-Komplex über Sulfatgruppen gebunden und mit Citratpuffer, Calciumchlorid und NaCl-Gradient eluiert wird. Der Faktor VIII-Komplex wird dabei mit einer Konzentration von 0,5 M NaCl vom Träger eluiert.

Die EP 0 416 983 beschreibt die Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex aus menschlichem Plasma durch Ausfällung mit einer Kombination aus Bariumchlorid und Aluminiumhydroxid und anschließende Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Fraktogel.

In der EP 0 411 810 erfolgt die Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex aus Kryopräzipitat mittels Heparin-Affinitätschromatographie und anschließende Elution des Komplexes mit Calciumchlorid. Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens wird in der WO 93/22337 beschrieben. Zur Entfernung von kontaminierenden Proteinen, wie Fibrinogen und Fibronektin, wird im Anschluß an die Elution mit CaCl_2 eine Glycin/NaCl-Fällung durchgeführt.

Zur Reinigung des Faktor VIII/vWF-Komplexes wurde ebenfalls vorgeschlagen, kontaminierende Proteine, wie etwa Fibrinogen, mit hohen Konzentrationen an Aminosäuren, insbesondere von Glycin, auszufällen, den in Lösung verbleibenden Faktor VIII/vWF-Komplex durch Zugabe eines calcium- und aminosäurehaltigen Puffers zu dissoziieren und anschließend Faktor VIII und vWF durch Anionenaustauschchromatographie getrennt voneinander zu gewinnen (WO 82/04395).

Die US 5,356,878 beschreibt die Herstellung von Faktor VIII-Komplex, bei dem kontaminierende Proteine (Fibrinogen, Vitamin-K-abhängige Faktoren oder Fibronektin) durch Fällung mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ und PEG abgetrennt, Faktor VIII-Komplex in Gegenwart von Glycin und NaCl chemisch virusinaktiviert und anschließend die nicht

Faktor VIII-Komplex-spezifischen Proteine durch Gelfiltration entfernt werden.

Hornsey et al. (Thromb. Haemost. 57:102-105 (1987)) reinigten Faktor VIII/vWF mittels Immunaффinitätschromatographie und erreichten eine spezifische Aktivität von 45 U Faktor VIII/mg Protein und 60 U Ristocetin-Aktivität/mg Protein. Allerdings ist das Endprodukt mit 4% Fibrinogen und 2% Fibronektin und vom Träger abgelösten Maus-Antikörpern verunreinigt.

Mejan et al. (Thromb. Haemost. 59: 364-371 (1988)) schlugen vor, Faktor VIII/vWF-Komplex mittels Immunaффinität direkt aus Plasma zu reinigen. Der gereinigte Komplex wurde mit humanem Serumalbumin stabilisiert und anschließend lyophilisiert. Mit den beschriebenen Elutionsbedingungen wurde jedoch eine teilweise Freisetzung der Antikörper von der Säule beobachtet, was zu einer Kontamination des Eluates mit monoklonalen Antikörpern führte und einen zweiten Reinigungsschritt zur Entfernung der Antikörper erforderte. Mejan et al. erreichten mit ihrem Verfahren eine etwa 1400-fache Anreicherung des Faktor VIII/vWF-Komplexes mit einer spezifischen Faktor VIII:C-Aktivität und Ristocetin-Aktivität von je 20 U/mg Protein, wobei das Produkt alle vWF-Multimere enthielt. Nach Stabilisierung des Komplexes mit 10 mg/ml Albumin wurde eine Stabilität von 3-4 Monaten bei -20°C beobachtet. Es wird jedoch immer wieder betont, daß eine besondere Schwierigkeit bei der Reinigung des Komplexes darin besteht, die Assoziation der Proteine zu erhalten, da beide Komponenten im Komplex instabil sind.

Harrison et al. (Thromb. Res. 50:295-304 (1988)) beschreibt die Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex durch Chromatographie an Dextransulfat-Agarose.

Die EP 0 600 480 beschreibt die Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mittels Anionenaustauschchromatographie, wobei das Eluat, enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, mit Heparin und Albumin stabilisiert und gegebenenfalls Lysin und Histidin als Antiproteasen zugegeben werden.

Kommerziell erhältliche Faktor VIII/vWF-Präparate weisen zum Teil keinen oder nur einen geringen Anteil an hochmolekularen vWF-Multimeren (vWF/HMW) auf und zeigen insbesondere in Abhängigkeit der Infusionszeit in vivo eine Reduktion der hochmolekularen vWF-Multimeren (Lethagen et al. (1992), Ann. Hematol. 65:253-259).

Die im Stand der Technik beschriebenen Faktor VIII-Präparate enthalten zwar zum größten Teil das gesamte vWF-Multimerpattern, jedoch variieren sie im Anteil an HMW-vWF und LMW-vWF und weisen sog. Triplet-Strukturen auf, die auf einen proteolytischen Abbau von vWF-Multimeren, insbesondere von vWF/HMW, hinweisen (Scott et al. (1993), Sem. Thromb. Hemost. 19:37-47, Baillo et al. (1992), Thromb. Res. 66:745-755, Mannucci et al. (1992), Blood 79:3130-3137). Die Stabilität dieser Präparate ist dadurch begrenzt.

Um die Präparate zu stabilisieren, entweder vor der Virusinaktivierung oder um ein lagerstabiles Präparat zu erhalten, wird immer wieder betont, daß die Zugabe eines Stabilisators, wie etwa Albumin, erforderlich ist.

Alle Faktor VIII-Konzentrate, die durch Reinigung des Proteins aus humanem Plasma erhalten werden, oder in Kontakt mit biologischem Material aus Säugetieren getreten sind, sind außerdem potentiell mit dem Risiko behaftet, mikrobiologische oder molekulare Pathogene, wie z.B. Viren, zu enthalten. Zur Herstellung eines sicheren Präparates ist daher auch immer eine Inaktivierung von pathogenen Organismen notwendig. Effektive Inaktivierungsverfahren können jedoch leicht auch zu einem Verlust der biologischen Aktivität des Faktor VIII-Komplexes führen. So stellten Palmer et al. fest (Thromb. Haemost. 63:392-402 (1990)), daß bei einer Hitzebehandlung zur effektiven Virusinaktivierung auch in Gegenwart eines Stabilisators mit einem Aktivitätsverlust zwischen 17% und 30% zu rechnen ist.

Es wird immer wieder betont, daß Faktor VIII/vWF-Konzentrate mit einer intakten Multimerstruktur möglicherweise einen guten Einfluß auf die Blutungszeit hätten, da sie die primäre Funktion

des vWF, die Plättchenagglutination, ausführen und eine höhere Affinität zu den Plättchenrezeptoren Glykoprotein Ib und IIb/IIIa haben als niedermolekulare vWF-Multimere (LMW-vWF) (Mannucci et al. (1987), Americ. J. Hematology 25:55-65). Es besteht jedoch die Schwierigkeit, daß während des Herstellungsprozesses von Faktor VIII-Konzentraten ein Abbau insbesondere der HMW-vWF-Moleküle erfolgt.

Es besteht daher ein Bedarf an einem Faktor VIII-Komplex mit einer ausreichenden spezifischen Aktivität an Faktor VIII:C und vWF-Aktivität, der eine verbesserte Stabilität aufweist und der auch ohne Zugabe eines nicht-Faktor VIII/vWF-Komplex-spezifischen Stabilisators über einen längeren Zeitraum stabil bleibt.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen Faktor VIII/vWF-Komplex mit einer verbesserten Stabilität zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch zur Verfügungstellen eines Faktor VIII/vWF-Komplexes, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält und frei ist von niedermolekularen vWF-Molekülen und proteolytischen vWF-Abbauprodukten, gelöst.

Die spezifische Plättchenagglutination gibt das Verhältnis von Ristocetin Co-Faktor-Aktivität und vWF-Antigengehalt wieder. Eine hohe spezifische Plättchenagglutinationsaktivität gibt daher die spezifische Aktivität der Multimeren an. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte sowohl für plasmatischen vWF (p-vWF) als auch rekombinanten vWF (r-vWF) bzw. Faktor VIII/vWF-Komplex gezeigt werden, daß bei einem hohen Multimerisierungsgrad des vWF die spezifische Plättchenagglutination (RistCoF / vWF:Ag) wesentlich erhöht ist im Vergleich zu niedermolekularen Multimeren.

Niedermolekularer p-vWF (p-vWF/LMW) und niedermolekularer r-vWF (r-vWF/LMW) besitzen nur sehr geringe Plättchenagglutination.

Diese Situation kann dadurch verdeutlicht werden, daß durch die sehr kurze vWF-Kette es zu keiner stabilen Verbindung mehrerer

Plättchen kommt. Demgegenüber können hochmolekulare (lange) vWF-Multimere mehrere Plättchen miteinander stabil verbinden.

Es wurde gezeigt, daß sowohl hochmolekularer p-vWF (p-vWF/HMW) als auch hochmolekularer r-vWF (r-vWF/HMW) in konzentrationsabhängiger Weise an Plättchen binden und eine höhere spezifische Plättchenagglutinationsaktivität aufweisen als niedermolekulare vWF-Multimere.

Der erfindungsgemäße stabile Faktor VIII/vWF-Komplex besitzt daher eine spezifische vWF-Plättchenagglutinationsaktivität von mindestens 50 U/mg vWF:Ag.

Im Plasma kommt Faktor VIII/vWF im Komplex in einem molaren Verhältnis von ungefähr 1:50 vor. Es wurde festgestellt, daß dieses Verhältnis im Plasma notwendig ist, um einen guten Schutz gegen proteolytischen Abbau, insbesondere durch Protein C, zu gewähren (Vlot et al. (1995), Blood 85:3150-3157).

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung besitzt der erfindungsgemäße Faktor VIII/vWF-Komplex ein molares Verhältnis von Faktor VIII zu vWF zwischen 0,01 und 100. Dies bedeutet, daß der Komplex ein Verhältnis von Faktor VIII-Molekülen zu vWF-Molekülen zwischen 1:100 bzw. 100:1 aufweist. Vorzugsweise liegt das molare Verhältnis von Faktor VIII zu vWF zwischen 1:30 und 1:70 beträgt, besonders bevorzugt bei 1:50, wobei durch den hohen Anteil an vWF/HMW im Komplex ein optimales Verhältnis zum Schutz gegen proteolytischen Abbau erhalten wird.

Erfindungsgemäß wird weiter ein stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex zur Verfügung gestellt, der hochmolekulare plasmatische vWF-Multimere mit einer Duplett-Struktur enthält.

Es wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, daß aus Plasma oder Kryopräzipitat ein durch ein chromatographisches Verfahren gereinigter Faktor VIII-Komplex erhalten wird, der aus vWF-Multimermolekülen besteht, die eine Duplettstruktur aufweisen. Dies war insbesondere deshalb überraschend, da aus Plasma oder Kryopräzipitat gereinigter vWF oder Faktor VIII/vWF-Komplex

nur mit einer Tripletstruktur der vWF-Multimeren bekannt war. Diese Tripletstrukturen entstehen durch proteolytischen Abbau von vWF-Multimeren und weisen auf eine Instabilität der vWF-Multimere hin. Von Palmer et al. (Thromb. Haemost. 63:392-402 (1990)) wurde beschrieben, daß bei der Herstellung von Faktor VIII-Konzentrat aus heparinisiertem Plasma und anschließender Virusinaktivierung das normale Tripletmuster sich verändert, und die Intensität der Triplet-Bande mit dem niedrigsten Molekulargewicht stark zunimmt, was auf einen verstärkten proteolytischen Abbau der vWF-Multimere hinweist. Im Gegensatz dazu wird bei der vorliegenden Erfindung ein Faktor VIII/vWF zur Verfügung gestellt, dem dieses vWF-Abbauprodukt vollkommen fehlt und der im wesentlichen die 2 Banden des ursprünglichen Triplets mit dem höheren Molekulargewicht enthält.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex zur Verfügung gestellt, der hochmolekulare rekombinante vWF-Multimere mit einer Singulett-Struktur enthält. Es wurde durch Multimeranalyse festgestellt, daß die vWF-Multimeren von rekombinantem vWF lediglich eine Singulettbande aufweisen, eine hohe strukturelle Integrität besitzen und frei sind von jeglichen proteolytischen vWF-Abbauprodukten. Der erfindungsgemäße Faktor VIII-Komplex, enthaltend hochmolekulare rekombinante vWF-Moleküle mit einer hohen strukturellen Integrität, ist daher sehr stabil und frei von niedermolekularen vWF-Multimeren und vWF-Abbauprodukten.

Der erfindungsgemäße stabile Faktor VIII/vWF-Komplex ist vorzugsweise frei von Plasmaproteinen, insbesondere von Plasmaproteasen, und frei von Fibrinogen und Fibronectin. Da Plasmaproteasen und Plasmaproteine, insbesondere aktivierte Plasmaproteine, wie Protein C, Faktor IIa oder Faktor IXa, vWF oder Faktor VIII proteolytisch degradieren und der erfindungsgemäße Komplex frei von Plasmaproteinen ist, besitzt er eine erhöhte Stabilität und Integrität der Proteine im Komplex.

Der erfindungsgemäße Komplex besitzt gegen proteolytischen Abbau eine erhöhte Resistenz, wodurch er beispielsweise bei Raumtemperatur, für mindestens 48 Stunden, vorzugsweise für mindestens 6

Tage stabil ist, und in lyophilisierter Form bei 4°C oder Raumtemperatur mehr als 2 Jahre lagerstabil ist.

Der erfindungsgemäße Faktor VIII/vWF-Komplex ist derart stabil, daß er als virussicherer Komplex zur Verfügung gestellt werden kann. Die Virussicherheit ist durch Verfahrensschritte zur Behandlung des Komplexes zur Inaktivierung von Viren bzw. Abreicherung von Viren gewährleistet.

Zur Inaktivierung von Viren eignet sich insbesondere eine Hitzebehandlung in Lösung bzw. festem, vorzugsweise lyophilisiertem Zustand, welche sowohl lipidumhüllte als auch nicht-lipidumhüllte Viren verläßlich inaktivieren kann. Beispielsweise wird der erfindungsgemäße Komplex gemäß der EP 0 159 311 in festem, nassem Zustand hitzebehandelt. Andere Verfahren zur Virusinaktivierung umfassen auch die Behandlung mit Detergenzien oder chaotropen Substanzen, beispielsweise gemäß der EP 0 519 901, WO 94/13329, DE 44 34 538 und EP 0 131 740.

Gemäß einen weiteren Aspekt der Erfindung wird ein stabiles, virussicheres Faktor VIII-Komplex-Konzentrat, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere mit hoher struktureller Integrität, zur Verfügung gestellt. Die hochmolekularen vWF-Multimere bestehen vorzugsweise aus einer Singulett- oder einer Duplett-Struktur und sind frei von niedermolekularen vWF-Multimeren und proteolytischen Abbauprodukten des vWF. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß das erfindungsgemäße Faktor VIII-Komplex-Konzentrat derart stabil ist, daß eine Behandlung zur Virusinaktivierung, wie etwa oben beschrieben, die Stabilität der Proteine, insbesondere der hochmolekularen vWF-Multimere im Komplex nur unwesentlich beeinträchtigt und daß dadurch die spezifische Aktivität von Faktor VIII:C und vWF-Ristocetin-Aktivität im Faktor VIII-Komplex oder Faktor VIII-/Komplex-Konzentrat bei einem Virusinaktivierungsschritt nur bis zu maximal 10% herabgesetzt ist. Bei bisher bekannten Faktor VIII-Komplex-Konzentraten war bei der Virusinaktivierung mit einem Verlust der Aktivität zwischen 20 und 30 % zu rechnen. Der erfindungsgemäße Faktor VIII/vWF-Komplex zeigte im Neoantigentest keine Veränderungen der Antigenstruktur nach dem Virusinaktivierungsschritt,

was die Stabilität der Proteine im Komplex bestätigt. Aufgrund der hohen Stabilität der hochmolekularen vWF-Multimeren ist auch eine hohe spezifische Plättchenagglutinationsaktivität von mindestens 50 U/mg vWF:Ag im erfindungsgemäßen Faktor VIII-Komplex-Konzentrat gewährleistet.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße stabile, virussichere Faktor VIII-Komplex-Konzentrat Faktor VIII und vWF in einem molaren Verhältnis von Faktor VIII zu vWF zwischen 0,01 und 100, vorzugsweise zwischen 0,05 und 1. Das Faktor VIII-Komplex-Konzentrat ist insbesondere frei von Plasmaproteinen, insbesondere von Plasmaproteasen, und frei von mikrobiologischen und molekularbiologischen Pathogenen.

Zur Verbesserung der Stabilität von gereinigten Proteinen werden gewöhnlicherweise Stabilisatoren, wie etwa Albumin, zugesetzt. Dabei wird jedoch durch die Zugabe des Fremdproteins die spezifische Aktivität des gereinigten Proteins herabgesetzt. vWF ist ein natürlicher Bestandteil des Faktor VIII-Komplexes. Es wurde gefunden, daß durch Zugabe von hochmolekularen vWF-Multimeren (vWF/HMW) zu einer gereinigten Faktor VIII-Fraktion aus Plasma oder aus rekombinanten Zellkulturen die Stabilität von Faktor VIII erhöht wird. Ebenso wurde gefunden, daß durch Zugabe von vWF/HMW zu einem gereinigten Faktor VIII-Komplex die Stabilität des Komplexes verbessert werden kann. Auf den Zusatz von üblicherweise verwendeten Stabilisatoren kann daher verzichtet werden. In Ausnahmefällen kann gegebenenfalls auch während der Gewinnung ein Proteaseinhibitor zugesetzt werden, um die intakte Struktur, insbesondere der vWF/HMW zu erhalten.

Erfindungsgemäß wird weiter eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen erfindungsgemäßen stabilen Faktor VIII/vWF-Komplex oder ein erfindungsgemäßes virussicheres, stabiles Faktor VIII-Komplex-Konzentrat, zur Verfügung gestellt.

In einer besonderen Ausführungsform enthält die pharmazeutische Zusammensetzung einen physiologisch akzeptablen Träger oder Puffer. Die Formulierung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparation kann in an sich bekannter und üblicher Weise erfol-

gen, z.B. mit Hilfe von Salzen und gegebenenfalls Aminosäuren, aber auch in Gegenwart von Tensiden vorgenommen werden. Aufgrund der oben beschriebenen hohen Stabilität des Komplexes kann auf die üblicherweise verwendeten Stabilisatoren oder Protease-Inhibitoren in der pharmazeutischen Zusammensetzung gegebenenfalls auch verzichtet werden.

Der erfindungsgemäße stabile Faktor VIII/vWF-Komplex wird vorzugsweise als hochreines Produkt erhalten, welches durch chromatographische Reinigungsverfahren erhalten wird. Die chromatographische Reinigung erfolgt insbesondere durch Ionenaustauschchromatographie und/oder Affinitätschromatographie. Dafür können u.a. Materialien zum Anionenaustausch, wie synthetische Trägermaterialien oder Träger auf Kohlehydratbasis, mit Liganden, wie DEAE, TMAE-, QAE-, Q-, oder Aminoalkylgruppen herangezogen werden, bzw. für die Affinitätschromatographie Träger mit immobilisierten Substanzen, die eine spezifische Affinität für vWF aufweisen. Geeignete Affinitätsmaterialien enthalten beispielsweise Heparin.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird daher ein Verfahren zur Gewinnung von stabilem Faktor VIII/vWF-Komplex zur Verfügung gestellt. Dabei wird Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteidlösung bei einer niedrigen Salzkonzentration an einen Affinitätsträger, vorzugsweise einen Heparin-Affinitätsträger, gebunden und stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer hohen Salzkonzentration gewonnen. Der Komplex wird dabei vorzugsweise an immobilisiertes Heparin bei einer Salzkonzentration von ≤ 150 mM gebunden und bei einer Salzkonzentration von ≥ 200 mM und ≤ 300 mM eluiert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird Faktor VIII/vWF-Komplex in einem CaCl_2 -freien Puffersystem durchgeführt. Auf diese Weise lassen sich Faktor VIII/vWF-Komplexe, enthaltend niedermolekulare vWF-Moleküle bzw. hochmolekulare vWF-Moleküle, selektiv voneinander trennen und Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Moleküle, kann bei einer höheren Salzkonzentration gewonnen werden. Für die Elution sind lösliche ein- und zweiwertige Salze verwendbar. Vorzugsweise wird NaCl verwendet. Calciumsalze sind für die Elution nicht

geeignet.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise an einer Heparin-Affinitätschromatographie-Säule durchgeführt. Für die Affinitätschromatographie kann jeder Träger, an den Heparin gebunden werden kann, verwendet werden. Als gut geeignet erwiesen sich zum Beispiel AF-Heparin Toyopearl® (ein synthetisches, großporiges, hydrophiles Polymer auf der Basis von Methacrylat) (Tosohaas), Heparin EMD Fraktogel® (ein synthetisches, hydrophiles Polymer auf der Basis von Ethylenglykol, Methacrylat und Dimethylacrylat) (Merck) oder Heparin Sepharose Fast Flow® (enthaltend natürliche Dextran-bzw. Agarosederivate) (Pharmacia).

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird als Puffersystem eine Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen, insbesondere Tris/HCl, Phosphatpuffer oder Citratpuffer, und gegebenenfalls Salz verwendet, die vorzugsweise frei von Stabilisatoren, Aminosäuren oder anderen Zusätzen ist.

Die Affinitätschromatographie wird vorzugsweise in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,5, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird eine Proteinlösung, enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, wie etwa eine Plasmafraktion, ein Kryopräzipitat oder ein zellfreier Kulturüberstand von transformierten Zellen, eingesetzt. Die Lösung kann auch eine angereicherte Proteinfraction eines chromatographischen Verfahrens sein.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Gewinnung des Faktor VIII/vWF-Komplexes läßt sich auf effiziente und einfache Weise ein Faktor VIII/vWF-Komplex, im wesentlichen enthaltend hochmolekulare vWF-Multimere, erhalten. Nach diesem Verfahren läßt sich deshalb ein physiologisch besonders aktiver Faktor VIII/vWF-Komplex mit guten Ausbeuten und in hoher Reinheit herstellen. Der so gewonnene Faktor VIII/vWF-Komplex zeichnet sich insbesondere durch eine spezifische Aktivität von Faktor VIII:C von mindestens 50 U/mg Faktor VIII:Ag und eine spezifische vWF-

Plättchenagglutinationsaktivität von mindestens 50 U/mg vWF aus und ist insbesondere frei von niedermolekularen vWF-Multimeren und vWF-Abbauprodukten.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Gewinnung von stabilem Faktor VIII/vWF-Komplex zur Verfügung gestellt, bei dem Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer unreinen Proteinlösung an einen Anionenaustauscher gebunden und kontaminierende Plasmaproteine bei einer Salzkonzentration von ≤ 200 mM in Anwesenheit von Calciumsalz selektiv eluiert werden. Anschließend wird Faktor VIII/vWF-Komplex vom Anionenaustauscher mit einer Salzkonzentration zwischen ≤ 200 und ≤ 400 mM erhalten. Dabei wird ein Faktor VIII/vWF-Komplex, im wesentlichen enthaltend hochmolekulare vWF-Multimere, gewonnen.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann als unreine Proteinlösung, enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, z.B. eine Plasmafraktion, ein Kryopräzipitat oder ein zellfreier Kulturüberstand von transformierten Zellen eingesetzt werden.

Die durch die Calciumsalze entfernten kontaminierenden Proteine sind insbesondere Plasmaproteine, darunter Vitamin K-abhängige Faktoren, wie z.B. Faktor II, Faktor IX, Protein C, Protein S, Plasmaproteasen wie Plasminogen, Fibronectin oder Fibrinogen. Das Entfernen der unspezifischen Proteine erfolgt insbesondere mit CaCl_2 als Calciumsalz im Elutionsmittel in einer Konzentration zwischen 1 mM und 15 mM, vorzugsweise von 10 mM.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde gefunden, daß das bisher eingesetzte Verfahren der Aluminiumhydroxid-Behandlung zur Abtrennung von Vitamin K-abhängigen Proteinen, Fibrinogen oder Fibronectin nicht ausreichend ist, um diese Proteine vollständig zu entfernen. Durch die Elution in Anwesenheit von Calciumchlorid wurde jedoch gewährleistet, daß diese Plasmaproteine im wesentlichen eliminiert werden und ein Plasmaprotein-freier Faktor VIII/vWF-Komplex gewonnen wird.

Die Anionenaustauschchromatographie wird vorzugsweise in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,5, vorzugsweise bei einem pH-Wert von

7,4, vorgenommen.

Die Elution des bei der Anionenaustauschchromatographie an den Anionenaustauscher gebundenen Faktor VIII/vWF-Komplexes erfolgt vorzugsweise durch Erhöhung der Salzkonzentration.

Als Anionenaustauscher wird vorzugsweise ein Anionenaustauscher vom quaternären Aminotyp, insbesondere ein Fraktogel mit Tentakelstruktur und insbesondere EMD-TMAE-Fraktogel verwendet.

Vorzugsweise wird Faktor VIII/vWF-Komplex an den Anionenaustauscher bei einer Salzkonzentration von ≤ 200 mM gebunden und bei einer Salzkonzentration von ≥ 270 mM, vorzugsweise bei ≥ 350 mM, Faktor VIII/vWF-Komplex, im wesentlichen enthaltend vWF/HMW, eluiert. Als Salze sind lösliche ein- und zweiwertige Salze einsetzbar, wobei NaCl bevorzugt ist.

Vorzugsweise wird der durch die Anionenaustauschchromatographie gereinigte Faktor VIII-Komplex weiterhin durch eine Affinitätschromatographie, vorzugsweise an immobilisiertem Heparin, in einer Pufferlösung, bestehend aus Puffersubstanzen und gegebenenfalls Salz, chromatographisch gereinigt.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zuerst eine aus Kryopräzipitat gewonnene Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion an einen Anionenaustauscher gebunden und nach Abtrennen der Begleitproteine, insbesondere der Plasmaproteine, in angereicherter Form Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend im wesentlichen hochmolekulare vWF-Multimere, eluiert. In einem weiteren Reinigungsschritt wird das Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Eluat mit einem Affinitätsträger mit kovalent gebundenem Heparin in Kontakt gebracht, wobei der Komplex an den Träger bindet. Nach Entfernen von Fremdschubstanzen und Fremdproteinen durch ein geeignetes Elutionsmittel wird der Faktor VIII-Komplex vom Affinitätsträger mittels einem ein- oder zweiwertigen Salz, vorzugsweise NaCl, in einem Puffersystem eluiert.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform erfolgt die Durch-

führung des Verfahrens mit aus rekombinanten Zellen gewonnenem Faktor VIII/vWF-Komplex. Dazu kann ein zellfreier Kulturüberstand von Zellen, die Faktor VIII und vWF koexprimieren, oder von kokultivierten Zellen, die mit Faktor VIII einerseits und mit vWF andererseits transformiert sind, verwendet werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung eines hochreinen stabilen Faktor VIII-Komplexes läßt sich auf einfache und effiziente Weise ein hochreiner Faktor VIII/vWF-Komplex, der frei ist von Antikörpern, frei von Plasmaproteinen, physiologisch aktiv und frei von mikrobiologisch und molekularbiologischen Pathogenen ist, erhalten.

Der aus Plasma oder aus rekombinanten Zellen gewonnene Faktor VIII/vWF-Komplex enthält gemäß der vorliegenden Erfindung insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, und ist frei von niedermolekularen vWF-Molekülen und vWF-Abbauprodukten. Wird der Faktor VIII/vWF-Komplex aus Plasma oder Kryopräzipitat gewonnen, so bestehen die vWF/HMW insbesondere aus Duplettstrukturen mit hoher Stabilität. Aus rekombinanten Zellen gewonnener Faktor VIII/vWF-Komplex enthält hochmolekulare vWF-Moleküle mit einer Singulettstruktur, hoher Stabilität und struktureller Integrität.

Mittels definierter Chromatographieschritte ist es daher gemäß der vorliegenden Erfindung möglich, FVIII/vWF, frei von anderen Gerinnungsfaktoren und weiteren Plasma-Proteasen, zu gewinnen. Dies wirkt sich insbesondere auf die Reinheit und Stabilität des Präparates günstig aus. Der erfindungsgemäß erhaltene Faktor VIII/vWF-Komplex liegt daher in einer besonders reinen Form vor. Die Reinheit des Komplexes ist vorzugsweise mindestens 90%, besonders bevorzugt 95%.

Dadurch, daß der gewonnene Faktor VIII/vWF-Komplex durch den hohen Gehalt an hochmolekularen vWF-Multimeren und die Abwesenheit von niedermolekularen Multimeren, vWF-Abbauprodukten, Fremdproteinen, wie z.B. Plasmaproteinen, besonders stabil ist, ist es nicht unbedingt erforderlich, Stabilisatoren zum gereinigten Produkt zuzugeben. Dadurch wird die spezifische Aktivität des reinen Produkts z.B. bei der Formulierung der pharmazeuti-

schen Zusammensetzung, nicht herabgesetzt und es wird vermieden, daß durch die Zugabe von Fremdproteinen gegebenenfalls Verunreinigungen oder infektiöse Partikel in das Produkt eingebracht werden.

In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines stabilen Faktor VIII/vWF-Komplexes zur Verfügung gestellt. Dabei wird einem über ein chromatographisches Verfahren gereinigten Faktor VIII oder Faktor VIII-Komplex eine gereinigte hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen zugesetzt, wodurch ein Faktor VIII/vWF-Komplex mit einem molaren Verhältnis von Faktor VIII zu vWF/HMW zwischen 0,01 (entspricht 1 Faktor VIII:100 vWF) und 100 (entspricht 100 Faktor VIII:1 vWF), vorzugsweise zwischen 0,03 (1:30) und 0,07 (1:70), besonders bevorzugt von 0,05 (1:50) erhalten wird.

Der über ein chromatographisches Verfahren gereinigte Faktor VIII oder Faktor VIII-Komplex kann dabei aus einer Plasmafraktion, einem Kryopräzipitat oder aus einem zellfreien Zellkulturüberstand von transformierten Zellen stammen.

Die für das Verfahren zur Herstellung des stabilen Komplexes eingesetzte hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen kann sowohl aus Plasma, einer Plasmafraktion, einem Kryopräzipitat oder einem zellfreien Kulturüberstand von transformierten Zellen stammen. Die gereinigte hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen enthält vorzugsweise eine spezifische Plättchenagglutinationsaktivität von mindestens 50 U/mg vWF:Ag, besonders bevorzugt von mindestens 80 U/mg vWF:Ag.

Zur Herstellung des stabilen Faktor VIII-Komplexes wird eine gereinigte Fraktion, enthaltend Faktor VIII oder Faktor VIII/vWF-Komplex, mit einer gereinigten hochmolekularen Fraktion von vWF-Molekülen in einem gewünschten molaren Verhältnis gemischt. Dazu wird in den jeweiligen Fraktionen der Gehalt an vWF, Faktor VIII, die Faktor VIII-Aktivität und spezifische vWF-Aktivität bestimmt und durch Zugabe der entsprechenden Menge an vWF/HMW das gewünschte Mischungsverhältnis eingestellt. Vorzugsweise erfolgt die Mischung derart, daß ein Faktor VIII/vWF-Komplex entsteht,

der ein molares Verhältnis von Faktor VIII zu vWF zwischen 1:100 und 100:1, vorzugsweise von 1:50 aufweist.

Gemäß der vorliegenden Erfindung kann jedoch auch ein Faktor VIII/vWF-Komplex hergestellt werden, der ein bestimmtes Verhältnis von spezifischer Faktor VIII:C-Aktivität zu spezifischer vWF-Plättchenagglutinationsaktivität aufweist. Besonders bevorzugt ist dabei ein Komplex, der ein Verhältnis der spezifischen Aktivitäten von 1:1 aufweist. Das gewünschte Mischungsverhältnis herzustellen, liegt dabei im allgemeinen Wissensstand eines Fachmannes.

Der gemäß der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellte stabile virussichere Faktor VIII-Komplex sowie das Faktor VIII-Komplex-Konzentrat können sowohl für die Behandlung von Hämophilie A als auch zur Behandlung des von Willebrand-Syndroms eingesetzt werden. Da das erfindungsgemäße Faktor VIII-Komplex-Präparat im wesentlichen hochmolekulare vWF-Moleküle enthält, eignet es sich insbesondere für die Behandlung von vWD Typ II.

Aufgrund des hohen Anteils von hochmolekularen vWF-Multimeren besitzt der erfindungsgemäße Komplex auch eine sehr gute Pharmakinetik, da die vWF/HWM eine höhere spezifische Plättchenagglutination und Stabilität in vitro und in vivo besitzen und sowohl in vitro als auch in vivo Faktor VIII stabilisieren. Durch die Stabilität und strukturelle Integrität der vWF-Multimere im Komplex ist eine verbesserte Halbwertszeit des vWF und insbesondere auch von Faktor VIII gegeben, wodurch gegebenenfalls die Intervalle einer Verabreichung des erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparates reduziert werden können. Damit wird insbesondere das Auftreten von inhibitorischen Antikörpern gegen Faktor VIII bei Hämophilie A-Patienten, z.B. durch häufige Gaben von Faktor VIII-Konzentraten, verhindert.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele sowie der Zeichnungsfiguren näher erläutert, wobei sie jedoch nicht auf diese beschränkt ist.

Es zeigen:

Figur 1: SDS-PAGE-Analyse des vWF-Multimermusters der einzelnen Fraktionen vor und nach Anionenaustauschchromatographie.

Figur 2: Nachweis von Faktor II in einzelnen Fraktionen vor und nach Anionenaustauschchromatographie und nach Entfernen von Faktor II durch Calciumchlorid-Elution.

Figur 3: Nachweis von Protein S in einzelnen Fraktionen vor und nach Anionenaustauschchromatographie und nach Entfernen von Protein S durch Calciumchlorid-Elution.

Figur 4: Nachweis von Faktor IX in einzelnen Fraktionen vor und nach Anionenaustauschchromatographie und Entfernen von Faktor IX durch Calciumchlorid-Elution.

Figur 5: Nachweis von Plasminogen in einzelnen Fraktionen vor und nach Anionenaustauschchromatographie und Entfernen von Plasminogen durch vorangegangene Lysin-Sepharose.

Figur 6: SDS-PAGE-Analyse des vWF-Multimermusters der einzelnen Fraktionen vor und nach Heparin-Affinitätschromatographie.

Figur 7: Multimeranalyse von p-vWF und r-vWF vor und nach Heparin-Affinitätschromatographie.

Figur 8: Vergleich der Bindung von r-vWF/HMW und p-vWF/HMW an Plättchen und graphische Darstellung der zugegebenen Menge an vWF und Plättchen-gebundener Menge an vWF.

Figur 9: Bindung von p-vWF/HMW und r-vWF/HMW an Plättchen und Multimeranalyse.

B e i s p i e l 1:

Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex durch Anionenaustauschchromatographie

10 g Kryopräzipitat wurden mit 70 ml Na-Acetat, pH 7,0, 160 mM NaCl und 50 U/ml Heparin bei 30°C für 10 min gelöst und bis zum vollständigen Auslösen bei Raumtemperatur für weitere 30 min in-

kubiert. Die Lösung wurde auf 15°C abgekühlt und bis zur Entfernung ungelöster Bestandteile zentrifugiert und der Überstand mit Aluminiumhydroxidgel behandelt. Die Lösung wurde an einen Fractogel-EMD-TMAE-Anionenaustauscher gebunden und zur Entfernung von Fremdproteinen der Anionenaustauscher mit 180 mM NaCl und 200 mM NaCl gewaschen. vWF und FVIII wurden als Komplex anschließend mit 400 mM NaCl eluiert. Die Faktor VIII:C- und vWF:RistoCoF-Aktivität des Ausgangsmaterials und der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Faktor VIII:C und vWF:RistoCoF-Aktivität des Aluminiumhydroxid-Überstandes und der Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie

Probe	Volumen	vWF:RistCoF	FVIII:C
	(ml)	(mU/ml)	(mU/ml)
Alu-Überstand	147	1060	2970
180 mM Eluat	254	-	-
200 mM Eluat	210	-	-
400 mM Eluat	132	1590	2890

Durch die Anionenaustauschchromatographie konnte Faktor VIII/vWF-Komplex mit einer erhöhten vWF:RistoCoF-Aktivität erhalten werden. Zur Untersuchung des vWF-Polymermusters wurden die einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie über SDS-PAGE (Laemmli (1970), Nature 227:680-685) analysiert (Figur 1 B). Das Polymermuster des vWF im gereinigten Faktor VIII/vWF-Komplex zeigt ein identes Bandenmuster und damit die gleiche vWF-Polymerzusammensetzung wie im Kryopräzipitat. Die Reinigung führte daher nicht zu einem proteolytischen Abbau von hochmolekularen vWF-Multimeren im Komplex.

B e i s p i e l 2:

Entfernen von Vitamin K-abhängigen Proteinen und Gewinnung von hochreinem Faktor VIII/vWF-Komplex

Ziel der Untersuchungen war es, einen FVIII/vWF-Komplex zu ge-

winnen, frei von Proteasen und anderen Gerinnungsfaktoren. Wie in Beispiel 1 beschrieben, wurde aufgelöstes Kryopräzipitat mit Aluminium-Hydroxid behandelt, und anschließend durch Anionen-Austauschchromatographie gereinigt. Zum Entfernen von nicht Faktor VIII/vWF-Komplex-spezifischen Proteinen wurden bei der Elution mit 180 mM NaCl 10 mM CaCl_2 zugesetzt. Die Faktor VIII:C- und vWF:RistoCoF-Aktivität des Ausgangsmaterials und der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2 : Faktor VIII:C- und vWF:RistoCoF-Aktivität des Ausgangsmaterials und der einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie

Probe	Volumen	vWF:RistCoF	FVIII:C
	(ml)	(mU/ml)	(mU/ml)
Alu-Überstand	146	1590	4250
180 mM Eluat/ 10 mM CaCl_2	195	-	-
200 mM Eluat	127	-	-
400 mM Eluat	83	2120	5140

Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE auf ihr vWF-Multimer-Muster untersucht (Figur 1A).

Aus der Multimer-Analyse geht hervor, daß das 400 mM-Eluat die hochmolekularen vWF-Multimere enthält, und ausgehend vom Kryopräzipitat kein Verlust, insbesondere an hochmolekularen vWF-Multimeren, auftritt. Durch den Zusatz von CaCl_2 -Ionen wird niedermolekularer vWF abgetrennt und ein Faktor VIII-Komplex, enthaltend einen höheren Anteil an hochmolekularen vWF-Molekülen, erhalten (Fig. 1A). Damit ist gezeigt, daß durch das Reinigungsverfahren ein proteolytischer Abbau der hochmolekularen vWF-Multimere vermieden wird und durch Zugabe von CaCl_2 -Ionen selektiv niedermolekulare vWF-Moleküle, wie etwa Dimere oder Tetramere, entfernt werden können, wodurch ein Faktor VIII-Komplex, im wesentlichen enthaltend hochmolekulare vWF-Multimere, gewonnen wird.

Die einzelnen Reinigungsstufen, enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, wurden auf die Anwesenheit von Vitamin K-abhängigen Proteinen vor und während der Anionen-Austauschchromatographie analysiert. Dazu wurden einzelne Reinigungsstufen und die einzelnen Fraktionen über ein SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine Membran transferiert und mittels Westernblot-Analyse die Vitamin K-abhängigen Proteine detektiert.

a. Nachweis von Faktor II in den einzelnen Reinigungsstufen

Zum Nachweis von Faktor II in den einzelnen Fraktionen wurde polyklonales Serum gegen Faktor II (Assera Faktor II, Stago) als 1. Antikörper eingesetzt und mit alkalischer Phosphatase konjugiertem polyklonalem Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat (Fa. Bio-Rad) als 2. Antikörper und anschließendem chromogenen Test detektiert.

Aus der Figur 2 ist ersichtlich, daß Kryopräzipitat Faktor II enthält. Dieser wird trotz vorangegangener Aluminiumhydroxid-Fällung als Verunreinigung bei 400 mM NaCl (zusammen mit FVIII/vWF) vom Anionenaustauscher eluiert (Spur E). Faktor II kann jedoch durch 10 mM CaCl_2 selektiv eluiert werden (Spur F), und vWF/FVIII bei nachfolgender Elution mit 400 mM NaCl frei von Faktor II gewonnen werden (Spur G).

b. Nachweis von Protein S in den einzelnen Reinigungsstufen

Zum Nachweis von Protein S in den Reinigungsstufen wurde polyklonales Kaninchen-anti-Protein S-Serum (Assera Protein S, Stago) als 1. Antikörper eingesetzt und mit Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat (Fa. Bio-Rad) als 2. Antikörper und anschließendem chromogenen Test detektiert.

Figur 3 zeigt den Nachweis von Protein S in einzelnen Reinigungsstufen vor und nach der Anionenaustauschchromatographie und nach Entfernen von Protein S durch Calciumchlorid-Elution.

Aus der Figur 3 ist ersichtlich, daß Protein S aus Kryopräzipitat trotz vorheriger Aluminiumhydroxid-Fällung als Verunreini-

gung bei 400 mM NaCl (zusammen mit FVIII/vWF) vom Anionenaustauscher eluiert (Spur E). Protein S kann jedoch durch 10 mM CaCl_2 selektiv eluiert werden (Spur F), und FVIII/vWF bei nachfolgender Elution mit 400 mM NaCl frei von Protein S gewonnen werden (Spur G).

c. Nachweis von Faktor IX in den einzelnen Reinigungsstufen

Zum Nachweis von Faktor IX in den Reinigungsstufen wurde polyklonales Kaninchen-anti-Faktor IX-Serum (Assera Faktor XI, Stago) als 1. Antikörper eingesetzt und mit Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat (Fa. Bio-Rad) als 2. Antikörper und anschließend chromogenen Test detektiert.

Figur 4 zeigt den Nachweis von Faktor IX in einzelnen Reinigungsstufen vor und nach der Anionenaustauschchromatographie und selektivem Entfernen von Faktor IX durch Calciumchlorid.

Aus der Figur 4 ist ersichtlich, daß Faktor IX trotz vorheriger Aluminiumhydroxid-Fällung als Verunreinigung bei 400 mM NaCl (zusammen mit Faktor VIII-Komplex) vom Anionenaustauscher eluiert. Durch Zugabe von 10 mM CaCl_2 wird Faktor IX jedoch selektiv eluiert (Spur D) und FVIII/vWF bei nachfolgender Elution mit 400 mM NaCl frei von Faktor IX gewonnen (Spur E).

Beispiel 3:

Entfernen von Plasmaproteasen und Gewinnung von hochreinem Faktor VIII/vWF-Komplex

Ziel der Untersuchungen war es, ein vWF/FVIII-Präparat zu gewinnen, frei von Proteasen und anderen Gerinnungsfaktoren. Eine wesentliche Verunreinigung des Kryopräzipitates stellt die Protease Plasminogen dar. Diese findet sich auch im FVIII/vWF-Eluat (400 mM Eluat) wieder.

Zur Entfernung von Plasminogen wurde Kryopräzipitat, wie oben beschrieben, aufgelöst und mit Aluminiumhydroxidgel behandelt. Anschließend wurde der Alu-Überstand durch ein Lysin-Sépharosegel filtriert, und davon direkt auf den Anionenaustauscher

WO 97/34930

(Fractogel EMD TMAE) aufgetragen. FVIII/vWF wurde, wie beschrieben, vom Anionenaustauscher mit 400 mM NaCl eluiert. Die Eluate vor und nach der Anionenaustauschchromatographie wurden auf Plasminogen mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und Plasminogen mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Plasminogen-Serum (Stago) als 1. Antikörper und anschließendem chromogenen Test detektiert.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß durch Filtration an Lysin-Sephrose die Protease Plasminogen vom vWF/FVIII selektiv abgetrennt wird.

B e i s p i e l 4: (derzeit nach Ansicht der Anmelderin der beste Weg zur Ausführung der Erfindung)

Heparin-Affinitätschromatographie von FVIII/vWF-Komplex

Für die Heparin-Affinitätschromatographie wurde Fractogel AF EMD-Heparin verwendet. Als Ausgangsmaterial diente FVIII/vWF, der durch Anionenaustauschchromatographie gemäß Beispiel 2 gereinigt wurde (400 mM Eluat). Zur Reinigung von FVIII/vWF über Affinitätschromatographie wurden 27 ml des 400 mM NaCl-Fractogel-Eluats 4-fach mit 81 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) verdünnt und auf die Heparin-Affinitätssäule aufgetragen. Die Säule wurde zuerst mit 100 mM NaCl und anschließend zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine mit 160 mM NaCl gewaschen. Der Faktor VIII/vWF-Komplex wurde anschließend durch Elution der Heparin-Säule mit 300 mM NaCl erhalten. Die Faktor VIII:C- und vWF:RistoCoF-Aktivität sowie der vWF:Ag-Gehalt im Ausgangsmaterial und den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie und der Heparin-Affinitätschromatographie wurden bestimmt und sind in den Tabellen 4 A und 4 B zusammengefaßt.

Tabelle 4 A: Faktor VIII:C- und vWF:RistoCoF-Aktivität des Ausgangsmaterials und der einzelnen Fraktionen vor und nach Anionenaustauschchromatographie

Probe	Volumen	vWF:Ag	vWF:RistCoF	FVIII:C
	(ml)	($\mu\text{g/ml}$)	(mU/ml)	(mU/ml)
Alu-Überstand	75	55	1700	5260
180 mM Eluat/ 10 mM CaCl_2	64	21	43	-
200 mM Eluat	33	1	-	-
400 mM Eluat	29	137	4250	9500

Tabelle 4 B: Faktor VIII:C- und vWF:RistoCoF-Aktivität des Ausgangsmaterials und der einzelnen Fraktionen vor und nach Heparin-Affinitätschromatographie

Probe	Volumen	vWF:Ag	vWF:RistCoF	FVIII:C
	(ml)	($\mu\text{g/ml}$)	(mU/ml)	(mU/ml)
Ausgangsmaterial	104	42	850	2630
160 mM Eluat	42	11	43	650
300 mM Eluat	28	92	2550	5840

Die Eluate der Heparin-Affinitätschromatographie wurden auf vWF-Polymerzusammensetzung untersucht (Figur 6).

Aus der Figur 6 ist ersichtlich, daß der hochmolekulare Anteil des vWF in der 300 mM NaCl-Fraktion erhalten wird. Diese Fraktion besitzt auch die höchste Faktor VIII:C- und vWF-Ristocetin-Cofaktoraktivität (Tabelle 4 B).

Aus der Summe der Ergebnisse ist klar erkennbar, daß sich durch die Kombination aus Anionenaustauschchromatographie und Heparin-Affinitätschromatographie sowohl vWF, FVIII, als auch deren Komplex aus Kryopräzipitat isolieren und reinigen lassen. Insbesondere mittels Heparin-Affinitätschromatographie ist es möglich, niedermolekulare vWF-Multimere und Abbauprodukte des vWF aus Kryopräzipitat abzutrennen.

B e i s p i e l 5 :**Bestimmung der spezifischen Ristocetin-CoFaktor-Aktivität von gereinigtem vWF oder vWF-Komplex**

Mittels chromatographischer Methoden wurde plasmatischer vWF (p-vWF) aus humanem Kryopräzipitat und rekombinanter vWF (rvWF) aus dem Fermentationsüberstand rekombinanter CHO-Zellen isoliert und gemäß Beispiel 2 gereinigt. Durch Heparin-Affinitätschromatographie und Elution mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen wurden Fraktionen mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad an vWF isoliert (gemäß Beispiel 4). Insgesamt wurden für p-vWF- und r-vWF-Fraktionen mit low-molecular-weight vWF (vWF/LMW) bei 120 mM NaCl, mit medium molecular weight (vWF/MMW) bei 230 mM NaCl und high molecular weight (vWF/HMW) bei 300 mM NaCl erhalten. Diese Fraktionen wurden auf ihren Gehalt an vWF:Ag mittels ELISA (Asserachrom vWF®, Boehringer Mannheim), an Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (vWF Reagenz, Behringwerke), ihre Multimerstruktur mittels SDS-PAGE und ihre Plättchenbindung untersucht.

Figur 7 zeigt die vWF-Polymeranalyse von plasmatischem vWF und rekombinantem vWF.

Besonders auffällig ist, daß vor der Reinigung von plasmatischem vWF im Kryopäzipitat die vWF-Dimere, -Tetramere oder -Multimere als Triplet-Strukturen vorliegen. Diese Triplet-Strukturen sind Abbauprodukte von vWF-Multimeren und sind auf im Plasma vorkommende Protease zurückzuführen. Nach der Reinigung sind insbesondere bei der vWF-MMW und vWF-HMW-Fraktionen nur noch Multimere mit Duplett-Strukturen zu erkennen. Durch das chromatographische Verfahren werden so vWF-Multimere mit veränderter Zusammensetzung und Struktur im Vergleich zu im Plasma vorkommenden vWF-Molekülen erhalten, was auf eine Abreicherung von Proteasen und niedermolekularen vWF-Abbauprodukten zurückzuführen ist.

Gegenüber plasmatischen vWF-Multimeren ist bei rekombinantem vWF deutlich das Vorkommen nur einer Singulett-Bande in den vWF-Multimeren zu erkennen. Die rekombinanten vWF-Multimer-Moleküle weisen eine hohe strukturelle Integrität auf und enthalten keine

proteolytischen Abbauprodukte, im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten vWF-Triplett-Strukturen des plasmatischen vWF.

Tabelle 5 und Tabelle 6 zeigen die spezifische Ristocetin-Cofactor-Aktivität (RistCoF/vWF:Ag) für p-vWF und r-vWF.

Tabelle 5: Spezifische Ristocetin-Cofactor Aktivität für verschiedene p-vWF-Fraktionen

Probe	Spezifische RistCoF-Aktivität (mU RistCoF / vWF:Ag)
p-vWF/LMW	3
p-vWF/MMW	10
p-vWF/HMW	56

Tabelle 6: Spezifische Ristocetin-Cofactor-Aktivität für verschiedene r-vWF-Fraktionen

Probe	Spezifische RistCoF-Aktivität (mU RistCoF / vWF:Ag)
r-vWF/LMW	1
r-vWF/MMW	6
r-vWF/HMW	41

Beispiel 6: Bindung von p-vWF und r-vWF an Plättchen

In einer weiteren Untersuchung wurde die Bindung von p-vWF und r-vWF an Plättchen untersucht. p-vWF/HMW bzw. r-vWF/HMW wurden mit konstanter Konzentration an Plättchen und Ristocetin inkubiert. Anschließend wurden die Plättchen durch Zentrifugation abgetrennt (Plättchensediment, gebundener vWF) und ein Überstand (nicht gebundener vWF) erhalten. Im Ausgangsmaterial und im Überstand wurde vWF:Ag und die Plättchen-gebundene Menge an vWF bestimmt. Als Kontrolle wurden idente Inkubationen ohne Ristocetin durchgeführt. Diese ergaben keine vWF-Plättchenbindungen. Das Verhältnis aus vWF-Konzentration im Inkubationsansatz und Plättchen-gebundenem vWF ist in Figur 8 dargestellt und zeigt im

direkten Vergleich das Bindungsverhalten von p-vWF/HMW und r-vWF/HMW. Anschließend an die Inkubationen wurden sowohl die Überstände (nicht gebundener vWF) als auch vWF im Plättchensediment (gebundener vWF) auf Multimerzusammensetzung untersucht. Die Ergebnisse der Multimeranalyse sind in Figur 9 zusammengestellt.

B e i s p i e l 7 :

Bestimmung der Stabilität von gereinigtem Faktor VIII/vWF-Komplex

Durch Anionenaustausch- bzw. Heparin-Affinitätschromatographie erhaltene Fraktionen wurden auf die Stabilität der vWF-Multimere sowie der Faktor VIII-Aktivität untersucht. Dazu wurden die in den einzelnen Reinigungsschritten erhaltenen Fraktionen bei -20°C, 4°C und Raumtemperatur für eine Zeitdauer bis zu 60 Tagen gelagert und jeweils nach 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 und 60 Tagen Proben einer vWF-Multimeranalyse, einer Faktor VIII:C- und vWF-Ristocetin-Cofaktor-Aktivitätsbestimmung unterzogen. Die Eluate der Anionenaustauschchromatographie bzw. Heparin-Affinitätschromatographie, bei denen durch Lysin-Sepharose die Plasmaprotease bzw. durch Calciumchlorid-Elution die Vitamin K-abhängigen Faktoren selektiv entfernt worden waren, zeigten dabei die größte Stabilität. Das vWF-Multimermuster war in diesen Proben auch nach 30 Tagen unverändert, während in den Proben, die keiner Lysin-Sepharose-Chromatographie bzw. Calciumchlorid-Elution unterzogen worden waren, abhängig von der Zeitdauer ein Auftreten von proteolytischen vWF-Abbauprodukten zu erkennen war. Insbesondere ist daher für die Erhaltung der Stabilität der hochmolekularen vWF-Multimeren die Entfernung von im Ausgangsmaterial vorhandenen Plasmaproteinen notwendig, da diese die Lagerstabilität stark beeinflussen bzw. herabsetzen.

B e i s p i e l 8:

Erhöhung der Stabilität des gereinigten Faktor VIII-Komplexes durch Zugabe von gereinigten hochmolekularen vWF-Multimeren

Zu verschiedenen durch chromatographische Reinigungsschritte erhaltenen Faktor VIII- bzw. Faktor VIII/vWF-Komplex-haltigen

Fraktionen wurden unterschiedliche Mengen an gereinigtem p-vWF/HMW oder r-vWF/HMW zugegeben, die Mischungen bei 4°C und Raumtemperatur über einen Zeitraum bis zu 40 Tagen inkubiert und die vWF-Multimerzusammensetzung sowie die Faktor VIII:C- und vWF-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität nach 0, 1, 5, 10, 20, 25, 30, 35 und 40 Tagen bestimmt. Die Stabilität der vWF-Multimere sowie die spezifische Ristocetin-CoFaktor-Aktivität war bei Eluaten, bei denen durch vorangegangene Chromatographie Plasmaproteine, insbesondere Plasmaproteasen, entfernt worden waren, am besten. Durch die Zugabe einer vWF/HMW-haltigen Fraktion zu den einzelnen Faktor VIII- bzw. Faktor VIII/vWF-haltigen Fraktionen bzw. zum Ausgangsmaterial aus Kryopräzipitat konnte insbesondere in den Fraktionen, die gemäß Beispiel 7 eine geringere Stabilität aufwiesen, eine Verbesserung der Stabilität erreicht werden. Abhängig von der Zugabe der Menge an hochmolekularen vWF-Multimeren konnte das Auftreten von proteolytischen Abbauprodukten sowie eine Reduktion der spezifische Aktivität an Faktor VIII und vWF-Aktivität zeitlich hinausgezögert werden.

B e i s p i e l 9:

Virusinaktivierung von gereinigtem Faktor VIII/vWF-Komplex bzw. gereinigtem Faktor VIII/vWF-Komplex nach Zugabe von hochmolekularen vWF-Multimeren und Bestimmung der Faktor VIII:C- und vWF-RistoCoF-Aktivität

Einzelne Fraktionen der chromatographischen Reinigungsschritte, sowie Fraktionen, zu denen gereinigte hochmolekulare vWF-Multimere bzw. Albumin zugegeben wurden, wurden einem Virusinaktivierungsverfahren unterzogen. Dazu wurden die Proben für 10 Stunden auf 60°C erhitzt und anschließend für 1 Stunde nochmals bei 80°C weiterinkubiert. Anschließend wurde eine vWF-Multimer-Analyse und eine Bestimmung der Aktivität der Faktor VIII:C- und spezifischen vWF-Plättchenagglutinationsaktivität durchgeführt. Es zeigte sich, daß insbesondere Proben, die nach Heparin-Affinitätschromatographie einen besonders hohen Anteil an hochmolekularen vWF-Multimeren und keine niedermolekularen vWF-Abbauprodukte enthalten, sowie eine hohe spezifische Ristocetin-Cofaktor-Aktivität aufwiesen, den geringsten Aktivitätsverlust an Faktor VIII und vWF zeigten. Auch bei Proben, denen zusätzlich

noch eine bestimmte Menge an gereinigten hochmolekularen vWF-Multimeren zugesetzt wurde, war der Aktivitätsverlust nach dem Inaktivierungsverfahren maximal 10%. Bei den Proben, denen Albumin zugesetzt worden war, sank die spezifische Aktivität bei Zugabe des Stabilisators und dann nochmals nach dem Inaktivierungsverfahren. Dadurch konnte gezeigt werden, daß durch die Anwesenheit von ausschließlich vWF/HMW bzw. durch Zugabe von hochmolekularen vWF-Multimeren die Stabilität der Proteine im Faktor VIII/vWF-Komplex wesentlich erhöht werden kann, ohne daß die spezifische Aktivität wesentlich reduziert wird.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält und frei ist von niedermolekularen vWF-Molekülen und proteolytischen vWF-Abbauprodukten.
2. Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er eine spezifische Plättchenagglutinationsaktivität von mindestens 50 U/mg vWF:Ag aufweist.
3. Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er ein molares Verhältnis von Faktor VIII zu vWF zwischen 0,01 und 100 aufweist.
4. Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis von Faktor VIII zu vWF zwischen 0,05 und 1 beträgt.
5. Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er hochmolekulare plasmatische vWF-Multimere mit einer Duplett-Struktur enthält.
6. Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß er hochmolekulare rekombinante vWF-Multimere mit einer Singulett-Struktur enthält.
7. Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die hochmolekularen vWF-Moleküle hohe strukturelle Integrität aufweisen.
8. Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß er frei ist von Plasmaproteinen, insbesondere von Plasmaproteasen, und frei von Fibrinogen und Fibronectin ist.
9. Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß er in Lösung lagerstabil ist.

10. Stabiler Faktor VIII/vWF-Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß er zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt ist.
11. Stabiles, virussicheres Faktor VIII-Komplex-Konzentrat, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere mit hoher struktureller Integrität, wobei die vWF-Multimeren aus einer Singulett- oder einer Duplett-Struktur bestehen und frei sind von proteolytischen Abbauprodukten des vWF.
12. Stabiles, virussicheres Faktor VIII-Komplex-Konzentrat nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es eine spezifische Plättchenagglutinationsaktivität von mindestens 50 U/mg vWF:Ag aufweist.
13. Stabiles, virussicheres Faktor VIII-Komplex-Konzentrat nach einem der Ansprüche 11 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es ein molares Verhältnis von Faktor VIII zu vWF zwischen 0,01 und 100 aufweist.
14. Stabiles, virussicheres Faktor VIII/vWF-Komplex-Konzentrat nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis von Faktor VIII zu vWF zwischen 0,05 und 1 beträgt.
15. Stabiles, virussicheres Faktor VIII-Komplex-Konzentrat nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es frei ist von Plasmaproteinen, insbesondere von Plasmaproteasen, und frei von mikrobiologischen und molekularbiologischen Pathogenen ist.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen stabilen Faktor VIII/vWF-Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 15.
17. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen physiologisch akzeptablen Träger enthält.
18. Verwendung eines stabilen Faktor VIII/vWF-Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Behandlung von Hämophile A

und/oder verschiedener Formen des von Willebrand-Syndroms.

19. Verfahren zur Gewinnung von stabilem Faktor VIII/vWF-Komplex, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Heparin-Affinitätsträger gebunden wird und Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 und ≤ 300 mM gewonnen wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß als Proteinlösung eine Plasmafraktion oder ein Kryopräzipitat, enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, verwendet wird.

21. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß als Proteinlösung ein zellfreier Kulturüberstand von transformierten Zellen, der Faktor VIII/vWF-Komplex enthält, zum Einsatz kommt.

22. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß als Proteinlösung eine angereicherte Proteinfraction verwendet wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß als Affinitätsträger ein Träger mit daran gebundenem Heparin verwendet wird, vorzugsweise AF-Heparin Toyopearl® (Tosohaas), Heparin EMD-Fraktogel® oder Heparin-Sepharose Fast Flow®.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß als Puffersystem für die Affinitätschromatographie eine Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen, vorzugsweise Tris/HCl-Puffer, Phosphatpuffer oder Citratpuffer und gegebenenfalls Salz verwendet wird.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitätschromatographie in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,5, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 7,4, erfolgt.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß als Salz NaCl verwendet wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß ein Faktor VIII/VWF-Komplex mit einer spezifischen Aktivität von Faktor VIII:C von mindestens 50 U/mg Protein und einer spezifischen Plättchenagglutinationsaktivität von mindestens 50 U/mg vWF erhalten wird.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß eine Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, erhalten wird, die frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren und vWF-Abbauprodukten.

29. Verfahren zur Gewinnung von stabilem Faktor VIII/vWF-Komplex, bei dem Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer unreinen Proteinlösung an einen Anionenaustauscher gebunden wird, dadurch gekennzeichnet, daß kontaminierende Plasmaproteine bei einer Salzkonzentration von ≤ 200 mM mit CaCl_2 selektiv eluiert werden und anschließend Faktor VIII/vWF-Komplex vom Anionenaustauscher mit einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 und ≤ 400 mM erhalten wird.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die kontaminierenden Proteine Plasmaproteine sind.

31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmaproteine insbesondere Vitamin K-abhängige Faktoren, Plasmaproteasen, Fibronektin oder Fibrinogen sind.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß das CaCl_2 im Elutionsmittel in einer Konzentration zwischen 1 mM und 15 mM, vorzugsweise von 10 mM, verwendet wird.

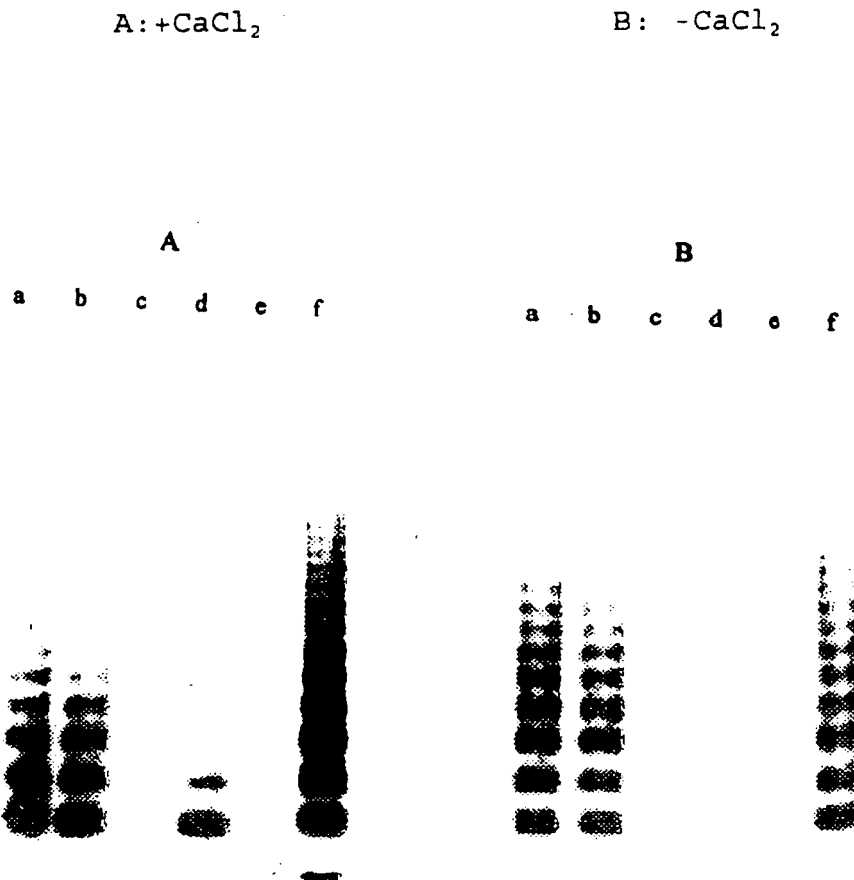
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,5, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 7,4, erfolgt.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß als Salz NaCl verwendet wird.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß ein Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, erhalten wird, der frei ist von niedermolekularen vWF-Molekülen und vWF-Abbauprodukten.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß die Fraktion, enthaltend den gewonnenen Faktor VIII/vWF-Komplex, einem weiteren chromatographischen Schritt, vorzugsweise einer Affinitätschromatographie, unterzogen wird.
37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß als Affinitätschromatographie eine Heparin-Chromatographie gemäß einem der Ansprüche 19 bis 27 ist.
38. Verfahren zur Herstellung eines stabilen Faktor VIII/vWF-Komplexes, dadurch gekennzeichnet, daß einem über ein chromatographisches Verfahren gereinigten Faktor VIII- oder Faktor VIII-Komplex eine gereinigte hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen zugesetzt wird, wodurch ein Faktor VIII/vWF-Komplex mit einem molaren Verhältnis von Faktor VIII zu vWF zwischen 0,01 und 100, vorzugsweise zwischen 0,05 und 1, erhalten wird.
39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß der gereinigte Faktor VIII- oder Faktor VIII-Komplex aus einer Plasmafraktion gewonnen wird.
40. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß der gereinigte Faktor VIII- oder Faktor VIII-Komplex aus einem zellfreien Zellkulturüberstand von transformierten Zellen gewonnen wird.
41. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die gereinigte hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen aus plasmatischem vWF besteht.
42. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die gereinigte hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen aus rekombinantem vWF besteht.

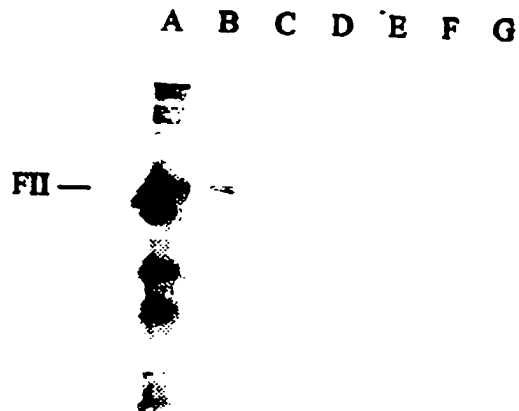
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 42, dadurch gekennzeichnet, daß eine hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen mit einer spezifischen Plättchenagglutinationsaktivität von mindestens 50 U/mg vWF:Ag gewonnen wird.

Figur 1: vWF-Multimer-Analyse vor und nach
Anionenaustauschchromatographie



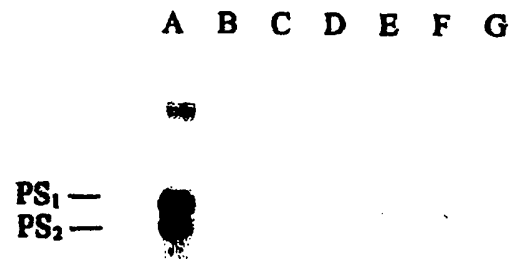
- a: aufgelöstes Kryopräzipitat,
b: Alu-Überstand,
c: nicht-gebunden an Anion-Austauscher,
d: 180 mM NaCl Eluat +/- 10 mM CaCl₂,
e: 200 mM NaCl Eluat,
f: 400 mM NaCl Eluat.

Figur 2: Nachweis von Faktor II in einzelnen Fraktionen
vor und nach Anionenaustauschchromatographie



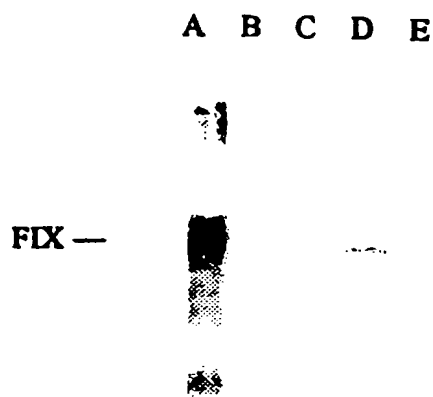
- A: Faktor II-Standard
- B: aufgelöstes Kryopräzipitat
- C: Alu-Überstand
- D: 180 mM NaCl Eluat
- E: 400 mM NaCl Eluat
- F: 180 mM NaCl/+10 mM CaCl₂ Eluat,
- G: 400 mM NaCl Eluat.

Figur 3: Protein S in den einzelnen Fraktionen
vor und nach Anionenaustauschchromatographie



- A: Protein S-Standard
B: aufgelöstes Kryopräzipitat
C: Alu-Überstand
D: 180 mM NaCl Eluat
E: 400 mM NaCl Eluat
F: 180 mM NaCl/+10 mM CaCl₂ Eluat
G: 400 mM NaCl Eluat

Figur 4 Faktor IX in den einzelnen Fraktionen
vor und nach Anionenaustauschchromatographie



- A: Faktor IX-Standard
- B: aufgelöstes Kryopräzipitat
- C: Alu-Überstand
- D: 180 mM NaCl/10 mM CaCl₂ Eluat
- E: 400 mM NaCl Eluat

figur 3

Plasminogen in einzelnen Fraktion

vor und nach Anionenaustauschchromatographie

A B C D

PG —



A: Plasminogen-Standard

B: aufgelöstes Kryopräzipitat

C: 400 mM Eluat Anionen-Austauscher

D: Eluat Lysin-Sepharose

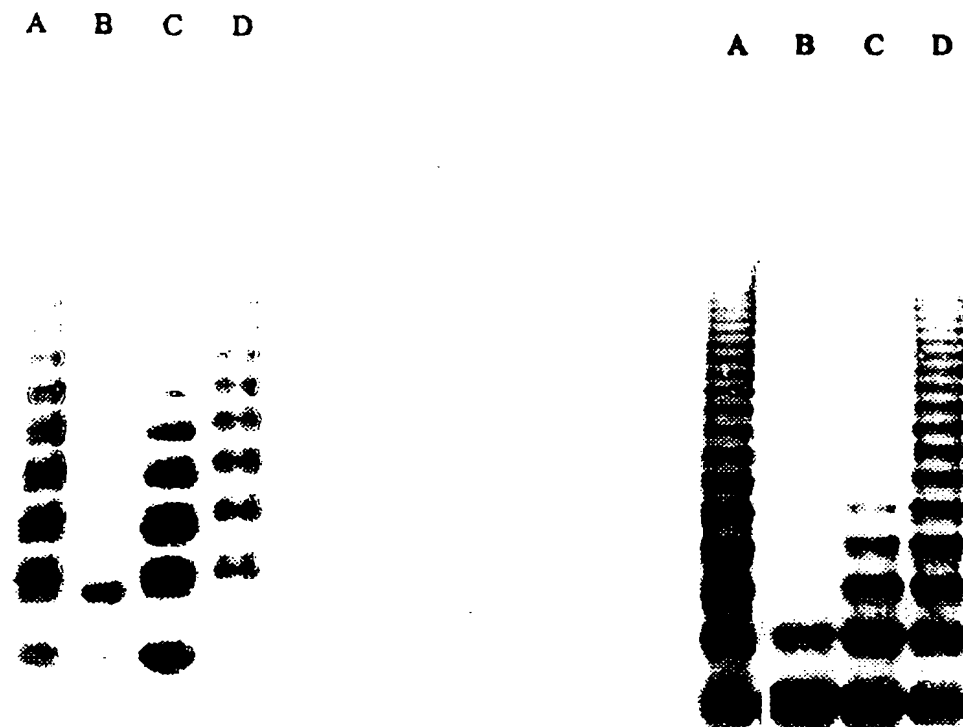
Figur 6 vWF-Multimeranalyse vor und nach Heparin-Affinitätschromatographie

A B C D



- A: Ausgangsmaterial vor Heparin-Affinitätschromatographie,
B: Faktor VIII/vWF-Komplex Eluat 160 mM NaCl,
C: Faktor VIII/vWF-Komplex Eluat 230 mM NaCl,
D: Faktor VIII/vWF-Komplex Eluat 300 mM NaCl

Figur 7 vWF-Multimeranalyse von p-vWF und r-vWF vor und nach Heparin-Affinitätschromatographie



I. p-vWF

A: p-vWF-Ausgangsmaterial

B: p-vWF/LMW

C: p-vWF/MMW

D: p-vWF/HMW

II. r-vWF

A: r-vWF-Ausgangsmaterial

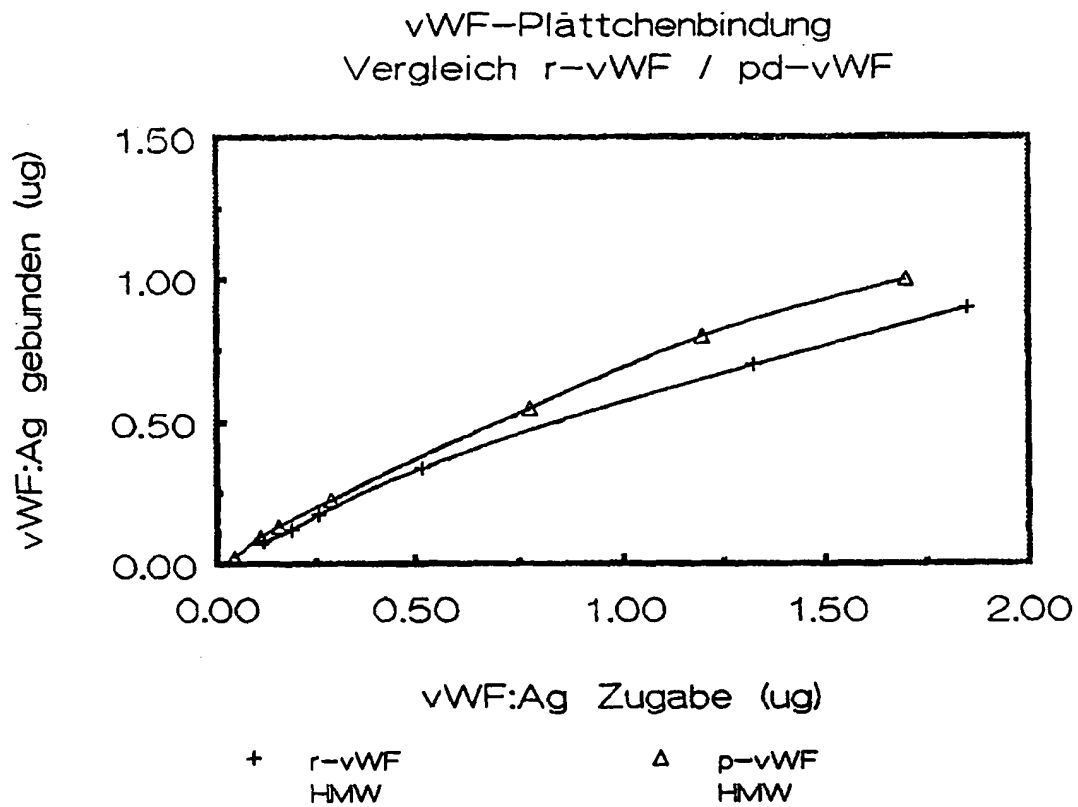
B: r-vWF/LMW

C: r-vWF/MMW

D: r-vWF/HMW

Figur 8 Vergleich der Bindung von r-vWF/HMW und p-vWF/HMW an Plättchen.

Graphische Darstellung der zugegebenen Menge an vWF und Plättchen-gebundenen Menge an vWF.



**Figur 9 Bindung von p-vWF/HMW und r-vWF/HMW an Plättchen und
Multimeranalyse**

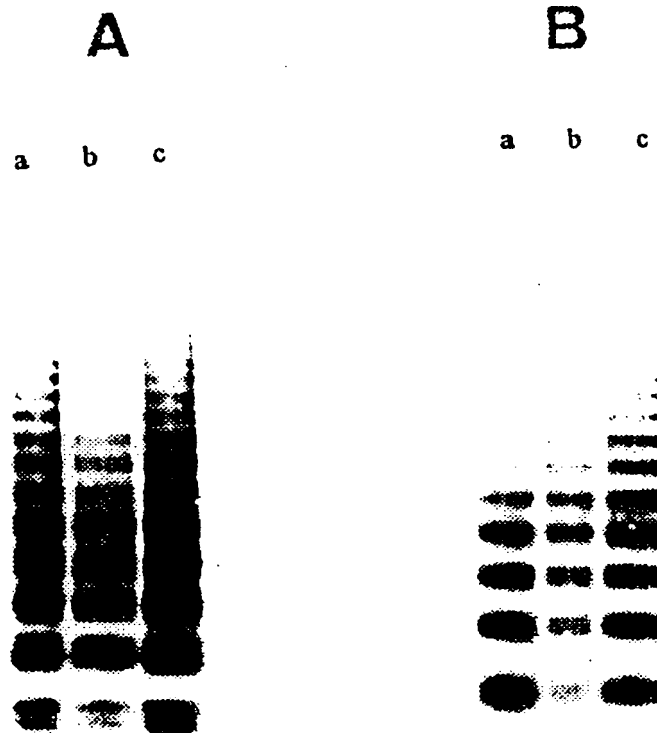
A: p-vWF/HMW;

B: r-vWF/HMW;

a: Nicht gebundener vWF;

b: Plättchen-gebundener vWF;

c: vWF-Ausgangsfraction nach Affinitätschromatographie.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 97/00055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C07K14/755 A61K38/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 35 04 385 A (THE SPECIAL TRUSTERS FOR ST. THOMAS' HOSPITAL, LONDON, GB) 14 August 1985 cited in the application see the whole document ---	1-43
X	EP 0 600 480 A (SCLAVO S.P.A.) 8 June 1994 cited in the application see the whole document ---	1-43
P,X	THROMBOSIS RESEARCH 84 (1). 1996. 55-66, XP000674503 FISCHER B E ET AL: "Effect of multimerization of human and recombinant von Willebrand factor on platelet aggregation, binding to collagen and binding of coagulation factor VIII." see the whole document --- -/--	1-43

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 June 1997

Date of mailing of the international search report

25.06.1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I. International Application No

PCT/AT 97/00055

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EP 0 705 846 A (IMMUNO AG) 10 April 1996 see the whole document ---	1-43
P,X	WO 96 10584 A (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT) 11 April 1996 see the whole document -----	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/AT 97/00055

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claim 18 relates to a method for treatment of the human or animal body (diagnostic procedure conducted on the human or animal body), the search was carried out, based on the alleged effects of the compound.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 97/00055

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 3504385 A	14-08-85	GB 2154591 A,B JP 60248619 A US 4578218 A	11-09-85 09-12-85 25-03-86
EP 600480 A	08-06-94	IT 1256622 B	12-12-95
EP 705846 A	10-04-96	DE 4435392 A CA 2159702 A JP 8119997 A	11-04-96 05-04-96 14-05-96
WO 9610584 A	11-04-96	DE 4435485 C AU 3803195 A	21-03-96 26-04-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/AT 97/00055

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/755 A61K38/37

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 35 04 385 A (THE SPECIAL TRUSTERS FOR ST. THOMAS' HOSPITAL, LONDON, GB) 14. August 1985 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-43
X	EP 0 600 480 A (SCLAVO S.P.A.) 8. Juni 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-43
P, X	THROMBOSIS RESEARCH 84 (1). 1996. 55-66, XP000674503 FISCHER B E ET AL: "Effect of multimerization of human and recombinant von Willebrand factor on platelet aggregation, binding to collagen and binding of coagulation factor VIII." siehe das ganze Dokument --- -/-	1-43

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Juni 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25.06.1997

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreau, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 97/00055

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	EP 0 705 846 A (IMMUNO AG) 10.April 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-43
P,X	WO 96 10584 A (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT) 11.April 1996 siehe das ganze Dokument -----	1-43

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 8
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der Anspruch 18 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers (Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird), bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/AT 97/00055

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 3504385 A	14-08-85	GB 2154591 A,B JP 60248619 A US 4578218 A	11-09-85 09-12-85 25-03-86
EP 600480 A	08-06-94	IT 1256622 B	12-12-95
EP 705846 A	10-04-96	DE 4435392 A CA 2159702 A JP 8119997 A	11-04-96 05-04-96 14-05-96
WO 9610584 A	11-04-96	DE 4435485 C AU 3803195 A	21-03-96 26-04-96